

(19)



KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 00145277 B1
(43)Date of publication of application: 28.04.1998

(21)Application number: 94021000
(22)Date of filing: 23.08.1994

(71)Applicant: CHEIL JEDANG CORPORATION
(72)Inventor: HWANG, JEONG KEON JIN, KI HONG NOH, HYUN MO PARK, YONG MAN

(51)Int. Cl C12N 1/20
C12N 9/50

(54) PROTEASE WHICH IS ACTIVE AT LOW TEMPERATURE HAVING SODIUM DODECYL SULFATE (SDS) RESISTANCE AND ALKALI RESISTANCE, AND MICROORGANISM PRODUCING IT

(57) Abstract:

PURPOSE: Vibiometschnikovii sp. RH 530A producing protease which is active at low temperature having SDS resistance and alkali resistance, gene coding the protease, recombinant plasmid containing the gene, and transfected microorganism by the recombinant plasmid are provided.

CONSTITUTION: Low temperature active proteases having SDS resistance and alkali resistance which is expressed by Vibiometschnikovii sp. RH 530 (KCTC 0088BP) are named Vap K of 27,500 dalton and Vap T of 45,000 dalton. Vap K keeps 90 % of its activity in SDS solution of 3 % and Vap T keeps 35 % of its activity under the same condition. Each Vap K and Vap T has highly similarity to alkalic elastase of bacillus, bacillus subtilisine Carlsberg etc. and preserves one of active regions such as Asp residue at Asp-30 (Vap K) and Asp-31 (Vap T).

COPYRIGHT 2000 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19940825)
Final disposal of an application (registration)
Date of final disposal of an application (19980203)
Patent registration number (1001452770000)
Date of registration (19980428)

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. 6
C12N 1/20
C12N 9/50

(11) 공고번호 특0145277
(24) 등록일자 1998년04월28일

(21) 출원번호	특1994-021000	(65) 공개번호	특1996-007772
(22) 출원일자	1994년08월23일	(43) 공개일자	1996년03월22일
(73) 특허권자	제일제당주식회사 김정순 서울특별시 중구 태평로 2가 150		
(72) 발명자	노현모 서울시 서초구 반포2동 미주아파트 1동 1003호 진기홍 서울시 양천구 목4동 황제아파트 5동 512호 박용만 인천시 중구 신흥동3가 64번지 황정근 인천시 관교동 쌍용아파트 2동 509호		
(74) 대리인	최학현 황주명		

심사관 : 김형준

(54) 나트륨 도데실 설페이트와 알칼리성 폐하에 내성을 갖는 저온활성형 단백질 분해효소 및 이를 생산하는 미생물

요약

본 발명은 나트륨 도데실 설페이트와 알칼리성 pH에 내성을 갖는 저온활성형 단백질 분해효소, 및 이의 제조방법 및 이를 생산하는 미생물을 제공한다.

대표도

도 1

명세서

[발명의 명칭]나트륨 도데실 설페이트와 알칼리성 폐하에 내성을 갖는 저온활성형 단백질 분해효소 및 이를 생산하는 미생물
[도면의 간단한 설명]제1도는 Vap K, Vap T 및 사비나제(Savinase)의 pH변화에 대한 최적활성결과도이다.제2도는 Vap K, Vap T 및 사비나제의 pH변화에 대한 잔존활성결과도이다.제3도는 Vap K, Vap T 및 사비나제의 온도변화에 대한 최적활성결과도이다.제4도는 Vap K, Vap T의 N-말단아미노산서열 및 기존알카리성 단백질 분해효소와의 비교도이다.제5도는 Vap T 유전자를 함유한 pAK 1의 유전자지도이다.제6도는 Vap T 유전자의 염기서열이다.제7도는 Vap T의 기존알카리성 단백질 분해효소와의 아미노산 상동성을 나타낸 것이다.[발명의 상세한 설명]본 발명은 한국 토양으로부터 분리동정한 호염기성 균주 비브리오 메취니코비 종 RH530(Vibrio metschnikovii sp. RH 530) 및 동균주로부터 세포외로 분비되는 2종류의 새로운 나트륨도데실 설페이트(SDS)내성, 알카리내성, 저온활성단백질 분해효소, 및 이를 코딩하는 유전자, 이 유전자를 함유한 재조합 플라스미드 및 이 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 미생물에 관한 것이다.현재 세계적으로 사용되는 세제용 단백질 분해용 효소는 알카리내성, 고온활성, 계면활성제내성을 기본으로하여, 표백제 내성효소가 주축이 되어 있다.이들 효소를 생산하는 균주는 주로 바실러스 종(Bacillus species)이며 곰팡이 트리티라치움 알룸(Tritirachium album)에서 생산되는 프로테이나제 케이(proteinase K)는 알카리성 단백질 분해효소로서 활성 pH가 8-11 정도인 서브틸리신(Subtilisin) 계열에 속하는 세린단백질 분해효소이다.(Ebeling 등, Eur. J. Biochem. 47, P91-97, 1974).프로테이나제 케이는 산업적 중요성으로 인하여, 열 안정성, Ca^{+2} 의존성, 3차원 구조의 해석이 밝혀졌으며, 최근에는 아미노산 서열 및 유전자의 염기 서열 등이 결정되었다.그러나, 프로테이나제 케이는 고가로 판매되고 있으므로 특수용도로 사용되고 있고, 세제용단백질 분해효소는 사용되고 있지 않다.현재 시판되고 있는 NOVO사나 GIST BROCADES사의 세제용단백질 분해효소는 서구형 세탁조건에 적합한 효소, 즉 고온활성형 단백질 분해효소이며, 저온수를 사용하는 한국 및 동남아의 세탁조건에는 적합하지 않은 효소로 알려져 있다. NOVO사에서 개발한 저온활성형 단백질 분해효소인 사비나제(Savinase) 및 GIST BROCADES사의 같은 유형의 효소인 막사칼(Maxacal)은 실제로 20°C-25°C에서 활성이 매우 낮은 편이고, 뛰어나게 저온활성을 보이는 단백질 분해효소는 아직 개발되어 있지 않는 상태이다.따라서, 본 발명의 목적은

이러한 기준의 단백질 분해효소들의 단점이 적은 단백질 분해효소를 생산하는 미생물 및 그 효소를 제공하는데 있으며, 본 발명에서 개발된 신규의 단백질 분해효소는 저온활성이 높으며, 알카리성 pH 및 세정원료인 SDS에 강한 내성을 보이고, 본 발명에 따라 분리된 신규미생물은 박테리아에 속하여 배양액의 회수가 쉬운 장점을 가지고 있기 때문에 상기 목적에 부합하다 할 것이다. 새로운 유형의 알카리성 단백질 분해효소를 개발하기 위해, 강한 염기성조건하에서 선별배양법을 통하여 토양으로부터 강한 단백질 분해활성을 보이는 호염기성 균주를 분리 등정하였다. 분리된 균주는 현미경 분석, 그람 염색법, API 20E, 20NE 및 32GN 키트등을 통하여 동정한 결과 분리된 균주가 비브리오 메취니코비로 밝혀졌으며, 이를 비브리오 메취니코비 종 RH 530으로 명명하였다. 이 균주는 1993년 10월 18일에 한국과학기술원 유전공학연구소 유전자 은행에 기탁되어 기탁번호 KCTC 0088BP로 분양 가능하다. 젤라틴 SDS-전기영동을 이용한 활성 염색법(Heussen 등, *J. Gen. Microbiol.* 187, p235-239, 1980)을 통하여 본 균주가 생산하는 단백질 분해효소의 종류 및 특성을 밝혔다. 실험결과, 본 균주는 분자량이 27.5KDa(prt7)인 알카리성 주요 단백질 분해효소와 최소 6종류의 미량 단백질 분해효소를 분비하였다. 젤라틴-SDS전기영동시 단백질 분해효소 저해제를 처리한 결과, 27.5KDa (prt7), 45KDa(prt3)을 포함한 대부분의 단백질이 세린계 단백질 분해효소이며, 나머지 1종이 메탈계 단백질 분해효소로 밝혀졌다(표 1). prt7과 prt3은 SDS에 하여 강한내성을 나타내었으며, 이들은 각각 Vap K 및 Vap T라 명명하였다.

[표1]

억제제	prt7	prt1	prt2	prt3	prt4	prt5	prt6
DPG, PGF, 트립신억제제	+	-	+	+	+	+	+
SDTA, 0-페난토린	-	+	-	-	+	-	-
POG, X-64, 엔스티린	-	-	-	-	-	-	-
중성디스티리날, 트립신억제제							
CaCl ₂ , MgCl ₂ , MgSO ₄	-	ND	ND	-	-	-	-
MgCl ₂	-	+	+	+	+	+	+
ZnCl ₂	-	ND	ND	-	+	+	+
LiCl	-	ND	ND	-	-	-	-
마법포에단올, DTT	-	+	-	-	+	+	+

+ : 젤라틴-PAGE후에 단백질분해효소 활성의 저해가 있는 경우 - : 젤라틴-PAGE후에 단백질분해효소 활성의 저해가 없는 경우
ND : 미탐색 Vap K 및 Vap T를 황산암모늄으로 분획침전하여, DEAE Sephadex A-25 크로마토그래피, CM-Sephadex C-25 크로마토그래피 및 Sephacryl S-200 크로마토그래피를 이용하여 각각 정제하였다. 정제된 효소는 SDS-전기영동상에서 그 분자량이 27.5KDa, 45KDa으로 나타났다. Vap K 및 Vap T의 SDS-내성을 합성펩타이드인 석시닐-L-Ala-L-Pro-L-Phe-P-니트로아닐리드(sAAPFpN)을 지질로 사용하여 결정하였다. 표 2에 나타난 것처럼 Vap K는 3%의 SDS용액에서도 90%이상의 활성을 유지하였으며, Vap T는 동일조건에서 35%의 활성을 유지하였다.

[표2]

SDS농도 (%)	활성도 (%)	
	Vap K	Vap T
0	100	100
0.5	103	88
1	98	74
2	98	47
3	93	35

반응조건 : 1) 온도 : 25°C 2) 시간 : 30분 3) 기질농도 : 0.5mM sAAPFpNVap K 및 Vap T, NOVO사의 Savianse 와 최적활성 pH를 조사한 결과 제1도에 나타난 바와같이 사비나제는 pH 8-12사이이며, Vap T와 Vap K는 pH 9-12 사이임을 알 수 있었고(제1도), pH별로 잔존 활성을 조사한 결과 Vap T와 Vap K가 pH11 이상에서 사비나제보다 훨씬 안정함을 알 수 있었다.(제2도). 제3도에 나타난 바와같이 저온활성형으로 개발된 NOVO 사의 사비나제보다 Vap K는 20°C에서 2배 더 활성이 높으며, 50°C 이상의 온도에서도 훨씬 안정한 활성을 유지함을 알 수 있었다. Vap K 및 Vap T의 최적활성 온도는 65°C 부근임을 알 수 있고, 따라서 Vap K 및 Vap T는 사비나제보다 저온 및 고온에서 활성이 더 좋으며, 산업적 응용성이 높다고 판단된다(제3도). Vap K 및 Vap T에 대하여 각각 36개와 40개의 N-말단 아미노산 잔기의 서열을 결정하였다(제4도). 이들은 바실러스의 알카리성 엘라스 타제(BAE)(Kaneto 등, *J. Microbiol.* 172, 467-473, 1989), 바실러스 서브틸리신 칼스버그(CAR)(Smith 등, *J. Biol. Chem.* 35, p1155-1156, 1968), 비브리오 아지노라이트쿠스 프로테아제(VPA)(Deane 등, *Gene*, 76, p281-288, 1989), 및 트리티라치움 알룸 프로테아제 K(PRK)(Jany 등, *FEBS Lett.* 199, p139-144, 1986)와 높은 유사성을 보였다. 또한 활성부위의 하나인 Asp 잔기가 Asp-30(Vap K)와 Asp-31(Vap T)로서 잘 보존되어있다. Vap T를 코딩하는 유전자를 환형성 방법을 통하여 대장균에 클로닝 하였다. 모든 양성균주들은 동일한 6.5kb HindIII조각을 가지는 제조합 플라스미드를 함유하였으며, 이중 한종은 pAK 1이라 명명하였다. pAK 1의 유전자 지도는 제5도에 나타나있다. Vap T의 유전자는 다음과 같은 성질을 가졌다. 1) Vap T의 모든 오픈리딩프레임(open reading frame)은 547개 아미노산을 코딩하며 5.7KDa의 전구체를 가질 수 있는 1.641bp로 이루어지며(제6도), 2) 성숙형 Vap T는 45KDa에 해당하는 428개의 아미노산으로 구성되며, 3) Vap T의 전구체는 프리(pre)-펩타이드, 프로(pro)-펩타이드 그리고 성숙형 효소로 이루어지며, 4) 오픈리딩프레임의 말단에 13개의 뉴클레오타이드로 이루어진 스템 투프(stem-loop)구조가 전사종결 신호로 작용함을 특징으로 한다. Vap T의 예측된 아미노산서열은 다음의 특징을 갖는다. 첫째, *Bacillus elastase YaB*, *B. licheniformis subtilisin Carlsberg*, *V. alginolyticus exoprotease A* 및 *T. album proteinase K*와 비교적 높은 상동성(homology)을 보임을 특징으로 한다. 둘째, 세린(serine)계열의 단백질 분해효소에서 전하전달 체계를 이루는

세가지 부위가 His-65, Asp-30, Ser-368로 잘 보존됨을 특징으로 한다(제7도). 넷째, 서브틸리신의 활성부위에 해당하는 His와 Ser간의 거리가 다른 서브틸리신 계열간의 거리보다 약 150개 아미노산이 더 길다(제6도). 넷째, Ca^{2+} 결합부위가 프로테이나제 케이보다는 서브틸리신과 가까움을 특징으로 한다. 본 발명은 이하의 실시예를 통하여 예시된다. [실시예 1] (비브리오 메취니코비 종 RH 530의 탐색 및 동정) 1g의 토양표본을 3ml의 중류수에 넣은 다음 섞은 뒤 상등액 1ml을 알칼리성 LSC-한천배지(pH 11)(1ℓ당 10g 박토-트립톤, 5g 효모추출물, 10g 염화나트륨 및 15g 박토-한천)에 직접 도말한 뒤 30°C에서 배양하였다. 24시간 지난 뒤 알칼리성 LSC-한천배지(pH 11)에 3차례 도말함으로써 각 콜로니(colony)를 선택하였다. 단백질 분해효소의 생산은 콜로니 주위에 투명환이 생기는 정도로 측정하였다. 선별된 균주는 현미경 분석, 그람-염색법, API 20E, 20NE, 32GN 키트 등을 사용하여 동정하였다. [실시예 2] (비브리오 메취니코비 종 RH 530로부터 분비되는 단백질 분해효소의 분석) 본 균주로부터 분비되는 단백질 분해효소들을 분석하기 위하여 젤라틴 SDS-전기영동을 통한 활성염색법을 사용하였다. 배양액으로 원심분리한 뒤, 1ml의 상등액을 0.1ml SDS(25% wt/vol)과 0.1ml의 글리세롤과 섞은 뒤 37°C에서 30분간 둔 뒤 SDS와 젤라틴을 기질로 사용하는 전기영동을 4°C에서 실시하였다. 전기영동 뒤, 젤을 트리톤 X-100에서 1시간 씻어 SDS를 제거한 뒤, 0.1M 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)에서 37°C의 온도로 3시간 둔 뒤 1%(wt/vol) 아미도 블랙으로 염색하였다. 단백질 분해효소의 활성은 젤라틴이 제거되어 투명해지는 부위로써 측정하였다. 알칼리성 등전점(isoelectric point)을 가지는 Vap K의 측정을 위해서, 단백질을 전통적인 SDS-나 자연(native) 전기영동(pH 6.8)에서 전극의 방향을 반대로하여 분리한 뒤 탈지분유-한천배지에 접착함으로써 그 활성을 측정하였다. [실시예 3] (단백질 분해효소에 대한 저해제의 영향) 다음의 단백질 분해효소저해제의 단백질 분해효소의 활성에 대한 영향은 젤라틴-젤을 트리톤 X-100과 0.1M 트리스-HCl 완충용액에서 반응시킬 때 각종 저해제를 처리하여 결정하였다 : DFP(1mM), PMSF(0.5-2mM), EDTA(2-5mM), o-페난트롤린(1mM), 콩트립신억제제(1mM), E-64(1mM), PCMB(1mM), 펩스타틴(1mM), 엘라스스타티날(10 μ g/mL), 머캅토에탄올(20mM), DTT(20mM), 및 히스티딘(0.5%), CaCl_2 , MgCl_2 , MnSO_4 , LiCl , ZnCl_2 , HgCl_2 등의 2가 양이온의 영향은 모두 1mM의 농도에서 수행하였다. [실시예 4] (Vap K 및 Vap T의 정제) LSC-배지(pH 10.5)에서 배양된 1ℓ의 배양액을 원심분리후 밀리포어 필터로 여과하였다. 전체 단백질 분해효소 활성을 80% 확산암모늄을 가하여 침전시킨 뒤 원심분리하였다. 단백질 침전물을 100ml의 20mM 트리스-HCl(pH 8.0)에서 녹인 뒤 동일 완충용액에서 투석하였다. 투석된 용액을 DEAE Sephadex A-25에 적용하였다. 여기서 Vap K의 활성을 포함하는 용출물을 다시 동일 칼럼에 적용하고 최종 용출물을 10mM 인산칼륨에 완충용액(pH 7.0)으로 평형화한 뒤 CM-Sephadex C-25 칼럼에 적용하였다. 이 후 0-0.5M KCl 구배를 포함하는 동일 완충용액으로 용출시켰다. 활성 Vap K 분획은 모아서 -70°C에 보관하였다. Vap T의 정제는, 위의 DEAE Sephadex A-25 칼럼을 0-0.5M NaCl 구배로 용출시켰다. 활성 Vap T 분획을 모아서 10mM 인산칼륨 완충액에서 투석한 뒤 CM-Sephadex C-25 칼럼에 한번 더 적용한 뒤 Amicon 농축기에서 농축하였다. 농축된 용액을 2.5x50cm Sephacryl S-200 칼럼에 적용한 뒤 50mM 트리스 HCl(pH 8.0)으로 용출시켰다. [실시예 5] (단백질 분해효소의 활성 측정) 단백질 분해 효소의 활성은 아조카세인(Sigma)의 가수분해 정도를 측정함으로써 결정하였다. 표준 반응용액(0.5ml)은 0.1% 아조카세인, 50mM CAPS[3-(사이클로헥실아미노)프로판설판산] 완충용액과 적당히 회색된 효소용액을 포함하였다. 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 15% 트리클로로아세트산을 등량 가하여 반응을 정지시키고, 업음에 5분간 두었다가 침전물을 3분간 원심분리(12,000g)한 뒤 상등액을 흡광도를 440nm에서 측정하였다. 활성 1유니트는 표준 반응에서 흡광도 0.1만큼 증가시키는 효소의 양으로 정하였다. [실시예 6] (N-말단 아미노산 서열분석) 정제된 Vap K 및 Vap T를 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 적용한 뒤 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 막(Matsudaira . J. Biol. chem. 257, p397-401, 1987)에 옮겨 가스상 마이크로시캔서에 적용하여 N-말단 아미노산 서열을 정하였다. [실시예 7] (Vap T 유전자의 클로닝) 비브리오 메취니코비 종 RH 530의 단백질 분해효소를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위하여, 염색체 DNA를 Hind III로 절단한 뒤 pUC19 HindIII 부위에 집어 넣었다. 연결된 혼합물은 대장균(E. coli) JM101에 형질전환시키고, 탈지분유-한천배지에서 투명환 생성여부로써 양성 형질 전환주를 선별하였다. [실시예 8] (Vap T 유전자의 염기 서열분석) 상기의 재조합 플라스미드 pAK1을 여러 가지 제한 효소나 Ba131 핵산 분해효소를 이용하여 아클로닝하였다. 이중 pAK1의 4.2kb의 HindIII-PstI 조각을 M13 파아지의 복제형 DNA에 접합시켜 삽입하였다. 이들을 대장균 JM101에 형질전환시켜 여러 플라크를 얻었다. 이 플라크를 JM101이 있는 2YT 배지(16g 트립톤, 8g 효모추출물, 5g NaCl) 배지에서 6시간 성장시킨 후 12,000rpm에서 2분간 원심분리하여 상등액을 얻고, 이 상등액 25 μ l를 SDS 전개 완충용액(2.7ml 글리세롤, 0.3ml 10X TEB, 1ml 1% SDS, 1ml EDTA, 1ml BPB/3ml) 5 μ l와 섞어 0.8% 아가로스에서 12시간 전개시켜 DNA의 크기를 결정하였다. 공지의 데일(Dale) 방법에 의해 연속적으로 절단된 파아지 DNA를 얻었다. 즉 상기 재조합 파아지 DNA 1 μ g을 0.5 A₂₆₀의 올리고머(RD20:5'-CGACGGCCAGTGAATTCCCC-3')와 결합시켜 부분적으로 이중가닥을 만든 후, 다시 제한 효소 EcoRI으로 42°C에서 2시간동안 T_4 DNA 중합효소 완충용액(33mM 트리스-아세테이트, pH 7.8, 66mM K-아세테이트) 하에서 절단한 후, 여기서 1 유니트의 T_4 DNA 중합효소를 첨가하여 10분 간격으로 3'-5' 엑소뉴클레아제로 절단하고, 또한 여기에 1mM dGTP 및 13 유니트의 TdT를 첨가하여 호모폴리머 털링(homopolymer tailing)하였다. 이 DNA를 다시 회수하여 상기의 RD20과 다시 결합시키고 T_4 DNA 접합효소 하에서 접합시킨 다음, 상기와 같이 형질전환시키고, DNA의 크기를 분석하였다. 이렇게 제조된 다양한 크기의 외래 유전자인 세라티오펩티다제 유전자를 함유한 파지 외가닥 유전자는 중첩된 부위를 가지고 있으며, 이를 공지의 생거(Sanger) 방법에 의해 염기서열을 결정하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

비브리오 메취니코비 종 RH 530로부터 발현된 분자량 45,000 달톤의 나트륨도네실 스페이트내성, 알카리내성 및 저온활성인 하기 아미노산 서열을 갖는 단백질 분해효소 :

MET De Lys Lys Asn Glu Lys Lys Arg Tyr Val
 Lys Lys Glu Thr Ile Ala MET Val Ala Glu Ser Ala Thr Ser Ala De Ala His
 Pro Thr Lys Thr Phe Asp Lys Ala Ser De Pro Thr Arg Tyr De Val Lys Phe
 Lys Glu Asp Glu Glu Pro Phe Ser MET Ala Ala Asn Pro Phe Trp Glu Pro Arg
 Ile Glu Glu Glu Ala Lys Lys Ser Glu Glu Ala Ser Asp De Glu Pro De
 Glu His Asp Ala Lys Tyr Ser Ala Lys Lys Ala Glu Glu Arg Val Glu Ala Lys
 Ser Glu Thr The Pro Trp Glu Tyr Phe Ala Val Lys Ala Asp Glu Lys Glu Asp
 Ser Glu Ala Glu Asn Glu Thr Ile Cys De De Asp Ser Glu Tyr Asp Lys Asp
 His Asn Asp Lys Ser Glu Ala Arg Val The Glu Thr Asn Asp Arg Glu The Glu
 Cys Trp Tyr De Pro Glu Ser Asn Asn Ala His Glu Thr His Val Ala Glu Tyr
 Ala Asp Ala De Ala Asn Glu Glu Val Lys Glu Lys Lys Pro Asn Glu Asn
 Val Asn Lys Ile De Val Lys Val Phe Asn Glu Ser Glu Trp Glu Tyr Ser Ser
 Thr Lys Val Arg Ala De Glu Thr Cys Ala Asp Asn Glu Ala Lys De Val Asn
 MET Ser Lys Glu Glu Ser Glu Ser Glu Ser Ser Arg Thr Glu Glu Asn Ala MET Asp Ala
 Lys Tyr Glu Arg Glu Val Lys MET De Ala Ala Ala Glu Asn Ser Glu Asn Thr
 Ala His Ser Tyr Pro Ala Ser Tyr Asp Ser Val Val MET Ser Val Ala Ala Val Asp

See Ann Tyr Asp His Ala Ser Pro Ser Glu Ala The Asn Glu Val Glu Ds Asp
Asp Pro Glu Val Ala Val Lys Ser Thr Val Ser Val Glu Glu Glu Val Lys Ser
Thr Ds Ds Thr Glu Asp Arg Arg Tyr Pro Arg Arg Glu Val' Val Pro His Ala Glu Ds' Tyr
Arg Lys Asn Asn Asn Glu Pro Glu Pro Glu Ser Ala Pro His Ala Glu Ds' Tyr
Thr Ala Pro Lys Ala Lys Cys Asp Thr Ser Ser Glu Arg Tyr Glu Cys Glu Arg
MEST Asn Glu Lys Ds Cys Lys Thr Glu Arg Ds Ala Asn Glu Thr Pro Ser Val
Arg Pro Glu Ds Asn Ala Val Ala Ala Cys Asn Asn Ala Glu Ala Lys Ala Ala
MEST Val Tyr Ser Asn Glu Glu Arg Pro Glu Lys Glu Asn Pro Pro Val Lys Asp
Glu Asn Thr Tyr Pro Lys Lys Ser Val Ser Val Ser Val Asn Arg Pro Asn Val Ds Glu
Glu Lys Ala Ala Lys Val Glu Glu Asp Ds Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Glu
Asn Tyr Glu Tyr Tyr Asn Glu Thr Ser MEST Ala Thr Pro His Val Ser Glu Val Ds
Asp Glu Lys Val Tyr Ser Tyr His Pro Glu Cys Ser Ala Lys Glu Ds Asp Arg Glu
Asn Lys Thr Glu Thr Ala Lys Asp Lys Asp Val Lys Ala Arg Tyr Ds Val Lys
Asp Glu Ds Val Thr Ser Thr Arg Lys Ds Lys Thr Glu Glu

청구항2

제1항의 단백질 분해효소를 코딩하고 하기 염기서열을 갖는 유전자 :

GGT GAC AAG AAA AAA CCC AAA TAA CCA CAT AAA TAT CAG TCA CCT ATT AAT CAG AAC
CCA TTA ACT TAT TTC GTT ATT TTT GTG ATC TTA TTT CAA TAA AAA TCC CAA TTA
TAA TTA TTT CCT TTT GTG ATT AAT TAT TTT GCG CTA TAC GTG ATC AAG TCA TTA
GTG TCG ATT ATG AAA TCT CCC GCA GTG ACA CGA TCG AAA TAT GAA ATT TTA CGG
GTG CAT TAT AGC ATC TGG CGA ACC GAC TGG ACC TGG ATC ACA ACT CGC AAA TCC
ATG ATC CTC CAT GAC TAT CGA TAA CAA CGC GAT CGG AGT GAG CGA ACC AAA TAG
TGT AGT ACC TGG AAC TCA ACT CGG TAA TAT AGG ATG ATC AAC CTC CAA AAA TAG
CGG TCA AAA AGG ACA CGG CAA ATG ATA AAA AAA AAC CAA TTA AAA CCT TAC GTT
AAA CTA CCT ACA ATA CGG ATG GTG GCC CGT ACT CGG ACT CCT CGG ATA CCT TAC CGC
CCA CGG TTG ACA TTT GAT AAA CGG AGT ATT CCT ACT CCT TAT ATT GTG AAA TTT
AAA CAA GAT GAA CAG CGA TTC TCG ATG CCT ATT AAC CGA CCA TTC TCG CGG CGA CGA
ATT CCT CGG CAA CCT CTA TTA TCA CGA ATA CAA CGC AGT GAT ATT GAA CCT ATT
GGT CAT GAT CCT TTA TAC ACC CGC AAA CTA CGA CGG CGC CCT TGA CGG CGC CTC
CGT TCA CCT CGG GAT ATC CGG TAT GTG CGA ATT CGC CGA CGG CGC CCT TTT TTA ATG
AGT GAA ACT AGC CCT TCG CCT TAT CGG GTG AAA CGG GAT CGA TTA CGA CGG
CGA CCT CGG CGC ATT AAC ATT TGT ATT CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT
CAT AAC GAT TCG ACC CGT AAC CGA GTG ACT CGA CGC AAC AAC GAT CGA CGA CGA CGA
CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA
CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA
ATT CGG CGC ATC CGT AAC ATT CGA CGC GTG AAA CGG TTA CTA CGA AAT CGA CGA CGA

ACC AGT TTA TCT TCA CTG CCT ACT GCT ACT GAT CCC TCT TAT ATT GCT GAG GAT
AAG ACC ATC GAA CAA AAC CAG TCA AGC CCA CCT TTT TAT GTG AAA TAC CAT CCT
CAC AAA AAA ATC CTG GTG CTC GAA CTA CTG AAA ACC TT

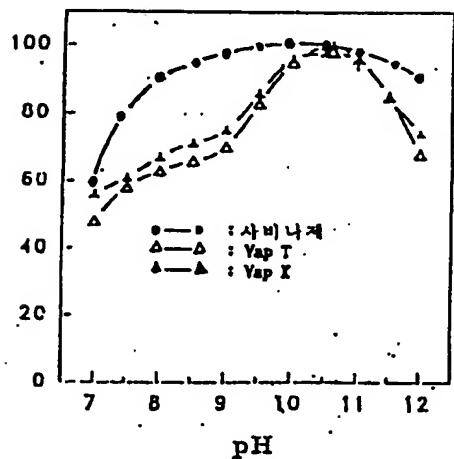
청구항3

비브리오 메취니코비 종 RH 530.

도면

도면1

상대 활성도(%)

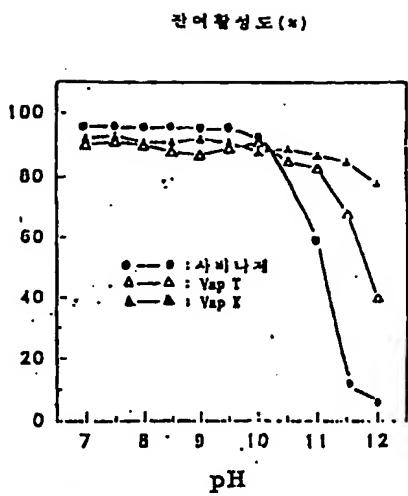


제 1회 판권 조건

1) 온도: 25 ℃

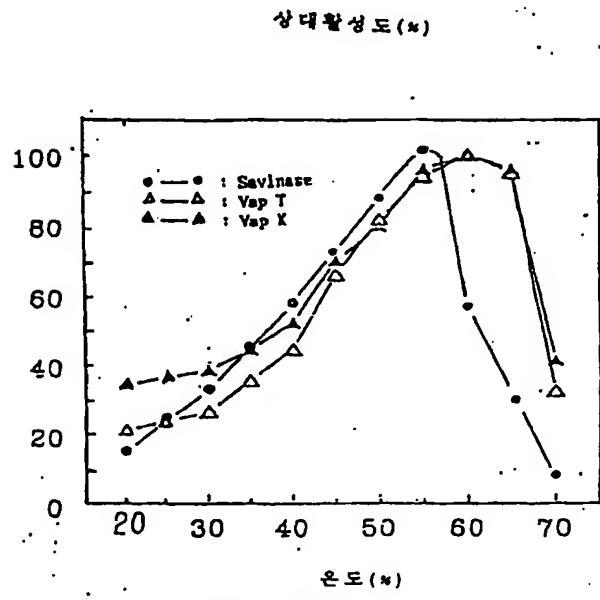
2) 반응 시간 : 10 분

도면2



제 2도. 반응 조건
 1) 보존 시간 및 온도 : 각 pH에서 24시간, 25 °C
 2) 반응 시간 및 온도 : 10분, 25 °C

도면3



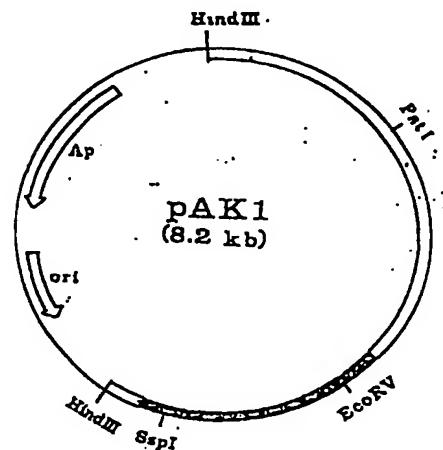
제 3도. 반응 조건
 1) pH : 10
 2) 반응 시간 : 각 온도에서 10분

도면4

Var E 및 Var T의 R-단은 아미노산의 위치가 다른 달라져 단백질 분자로써의 역할

W65	Ala	Glu	Ile	The	... - - - Pro	Tyr	Gly	Ile	Arg	Val	Val	Glu	Asp	Glu	Leu	Asp	Asp	Tyr	... - - -	(1-10)	
W67	Ile	Asp	The	The	... - - - Pro	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Leu	Leu	Asp	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	The	... - - -	(1-11)	
W68	The	The	The	The	... - - - Pro	Tyr	Gly	Ile	Asp	Arg	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Glu	Asp	Glu	The	... - - -	(1-11)
W69	Ala	Asp	The	The	... - - - Pro	Tyr	Gly	Ile	Asp	Asp	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Glu	Asp	Glu	The	... - - -	(1-11)
W70	Ala	Asp	Glu	The	... - - - Pro	Tyr	Gly	Ile	Asp	Arg	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Glu	Asp	Glu	Tyr	Asp	(1-12)
W71	Ala	Asp	Glu	The	... - - - Pro	Tyr	Gly	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu	Asp	Glu	Asp	Glu	Tyr	Asp	(1-12)

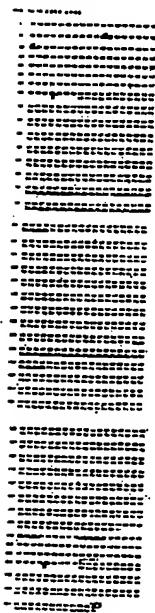
도면5



Vap T 유연차를 포함하는 초기 제조인 플라스미드

PAK1의 유전자지도.

도면6



도면7

